

⑫ 公開特許公報 (A)

平4-80202

⑬ Int. Cl. 5

C 08 B 37/08
A 61 K 31/725
C 08 B 37/10

識別記号

ADU Z

庁内整理番号

7624-4C
9164-4C
7624-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)3月13日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全15頁)

⑮ 発明の名称 煙脂質結合グリコサミノグリカン

⑯ 特願 平2-193818

⑰ 出願 平2(1990)7月24日

⑱ 発明者 桜井 勝清 東京都東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社 東京研究所内

⑲ 発明者 杉浦 信夫 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分子医学研究所内

⑳ 発明者 木全 弘治 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分子医学研究所内

㉑ 発明者 鈴木 旺 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分子医学研究所内

㉒ 出願人 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

㉓ 代理人 弁理士 津国肇 外1名

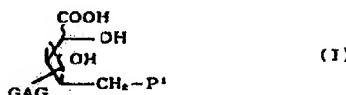
明細書

1. 発明の名称

煙脂質結合グリコサミノグリカン

2. 特許請求の範囲

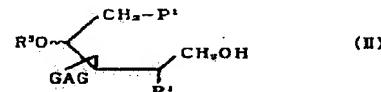
1. 一般式



を有する煙脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、C、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P'は1級アミノ基を有する煙脂質を示す。

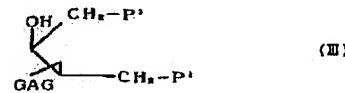
2. 一般式



を有する煙脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、R'はOH又はNHCOCH₃を示し、R''は水素又はSO₃Hを示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基、或いはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P'は1級アミノ基を有する煙脂質を示す。

3. 一般式



を有する煙脂質結合グリコサミノグリカン又はそ

特開平4-80202(2)

の塩。

上記式中、GAGはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P⁺は1級アミノ基を有する磷脂質を示す。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、癌転移抑制剤として有用な磷脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩に関するもの。

[従来の技術]

癌転移は、血管内やリンパ管内に流出した癌細胞が、血管内皮細胞やその下の基底膜と呼ばれる血管内皮細胞の細胞外マトリックスと接着し、接着した癌細胞が細胞外マトリックス内に湿润・透過して新しい組織に転移巣をつくることが知られている。例えば S. Korach らは (Cancer Research 46, 3624~3629, (1986)) 癌細胞のクローニングで高転移性細胞と低転移性細胞の群に分け、培養内皮細胞に対する *in vitro* での接触試験で、高転移性の癌細胞は高い接着率を示し、

低転移性のものは低い接着率を示すことから、血管内皮細胞やその細胞外マトリックスに対する接着性が癌の転移と深くかかわっていることを報告している。

また、細胞外マトリックス成分であるフィブロネクチンの細胞接着部位にあるペプチド・GRGDsは、拮抗的に細胞と細胞外マトリックスとの結合を阻害する。山田らは (Science 233, 467~470, (1986)) このペプチド・GRGDsが B16F10細胞のマウスにおける肺転移を抑制することを示している。このことから、非常に微量で細胞接着阻害活性を持つ物質は癌転移抑制剤として利用し得ることを示唆している。

[発明が解決しようとする課題]

本発明は、磷脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩が、上記の癌細胞の血管内皮細胞や細胞外マトリックスへの接着を阻害することにより、癌の転移を抑制する知見を得て本発明をなしめた。

[課題を解決するための手段]

本発明は、下記磷脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩である。

グリコサミノグリカンは表1に示すように、D-グルコサミン又はD-ガラクトサミンと、D-グルクロン酸、L-イズロニン酸及び/又はD-ガラクトースの2糖又は4糖の繰り返し単位より構成されている長い鎖状の多糖であり、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸が知られている。

表 1

グリコサミノグリカン	ヘキソサミン	ウロコ酸
ヒアルロン酸 (MW 1000~1000万)	GlcNAc	GlcUA
コンドロイチン (MW 1000~10万)	GlcNAc	GlcUA
コンドロイチン硫酸A (MW 1000~10万)	GlcNAc(4S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸C (MW 1000~10万)	GlcNAc(6S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸D (MW 1000~10万)	GlcNAc(6S)	GlcUA(2S)
コンドロイチン硫酸E (MW 1000~10万)	GlcNAc(4S, 6S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸K (MW 1000~10万)	GlcNAc(4S)	GlcUA(3S)
コンドロイチンポリ硫酸 (MW 1000~15万)	GlcNAc(S)	GlcUA(S)
デルマタン硫酸 (MW 1000~2万)	GlcNAc(5S)	IduUA, GlcUA
ヘパリン (MW 1000~2万)	GlcNS(6S)	GlcUA, IduUA(2S)
ヘパラン硫酸 (MW 2000~2万)	GlcNS(NAc, S)	GlcUA, IduUA(2S)
ケラタン硫酸 (MW 2000~2万)	GlcNAc(6S)	Gal
ケラタンポリ硫酸 (MW 1000~2万)	GlcNAc(6S)	Gal(6S)

GlcNAc : N-アセチルD-グルコサミン

GlcNS : N-アセチルD-ガラクトサミン

GlcUA : D-グルクロン酸

IduUA : L-イズロニン酸

Gal : D-ガラクトース

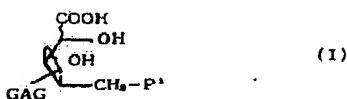
S : O-硫酸

特開平4-80202(3)

本発明の糖脂質結合グリコサミノグリカンは、その塩であることができ、好ましくはナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属塩：カルシウム、マグネシウムのようなアルカリ土類金属塩：トリアルキルアミン、ピリジンのようなアミン塩であることができる。

本発明の糖脂質結合グリコサミノグリカンは、次のものを包含する。

一般式

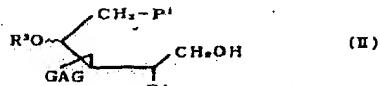


を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、C、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分

を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P'は1級アミノ基を有する糖脂質を示す。

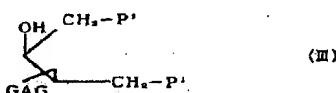
一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、R'はOH又は NHCOCH_3 を示し、R'は水素又は SO_3H を示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基、或いはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P'は1級アミノ基を有する糖脂質を示す。

一般式

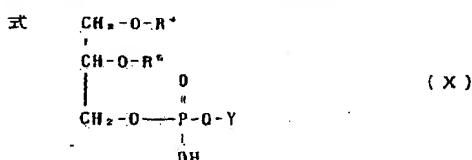


を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAGはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P'は1級アミノ基を有する糖脂質を示す。

グリコサミノグリカンの分子量は好ましくは前記表1に記載のものが用いられる。

上記式(I)、(II)及び(III)のP'で示される1級アミノ基を有する糖脂質としては、



(式中、R'及びR"はそれぞれ水素、 $-\text{CH}=\text{CHR}'$ 又は $-\text{COR}'$ (R'及び

R"は C_6-H_4 のアルキル基)であり、Yは $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH})-\text{COOH}$ である)

で示されるものが用いられる。特にR'及びR"がともにヘキサデカノイル又はオクタデカノイルのような $-\text{COR}'$ であるか、R"が $-\text{CH}=\text{CHR}'$ でR"が $-\text{COR}'$ であるものが好ましい。

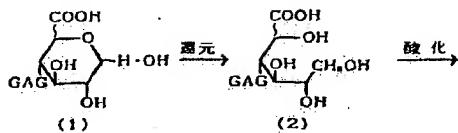
以下に、本発明の糖脂質結合グリコサミノグリカンの製造法について詳しく説明する。

還元末端限定酸化法

この方法は、グリコサミノグリカンの還元性末端のウロシ酸部分もしくはガラクトース部分又はヘキソサミン部分を還元及び部分酸化することにより開裂させてアルデヒドを形成させ、このアルデヒドと糖脂質の1級アミノ基との間の還元的アルキル化反応により、糖脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。この方法を反応式で示せば次のとおりである。

特開平4-80202(4)

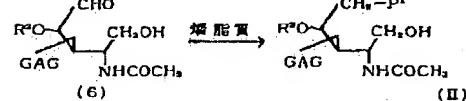
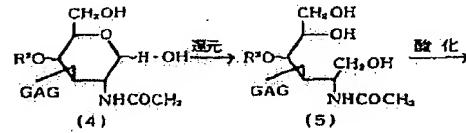
(A) 還元性末端糖のグルクロン酸又はイズロン酸に反応する場合



(P' は 1 級アミノ基を有する焼脂質を示す)

還元性末端がC-2にOHを有するD-グルクロン酸又はL-イズロングルコン酸である式(1)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンボリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリンを原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(I)の糖脂質結合グリコサミノグリカンが製造できる。

(B) 適元性末端糖のグルコサミン又はガラクトサミンに反応する場合

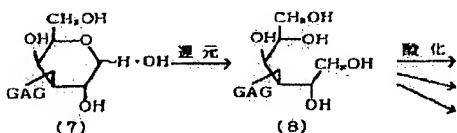


(式中、R' は前述と同じ、P' は 1 級アミノ基を有する燐脂質を示す)

還元性末端の C-5 に CH₂OH を有するグルコサミン又はガラクトサミンである式(4)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 K、コンドロイチンボリ硫酸又はデルマタン硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(II)の構成質結合グリコサミノグリカンが製造できる。

(C) 還元性末端糖のガラクトースに反応する

場合



(式中、P' は I 級アミノ基を有する焼脂質を示す)

還元性末端糖がガラクトースである式(7)の
ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸を原料として
使用したとき、上記反応式に従い、式(I)、
(II)及び(III)の糖脂質結合グリコサミノグリ
カンが製造できる。

上記 (A)、(B) 及び (C) の方法においては、先ず、上記式 (1)、(4) 及び (7) で示されるグリコサミノグリカンを還元して還元性末端糖部分を開裂させて式 (2)、(5) 及び (B) の化合物とする。

この還元に使用しうる還元剤としては、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどの水素化ホウ素アルカリ塩等を用いることができる。

また、上記還元反応における溶媒は、水又は0.05%ホウ酸塩緩衝液(pH8.3)等を用いることができる。

また還元反応温度は、通常10~30°C、好ましくは15~25°Cで行うことができる。

還元剤の使用量は、その種類等によっても異なる。

特開平4-80202(5)

るが、一般には式(1)、(4)又は(7)の化合物1モルに対して5~50当量、好ましくは25~30当量の範囲である。

得られる式(2)、(5)及び(8)の化合物を次いで部分的に酸化すると、式(3)、(6)、(9)、(10)及び(11)のアルデヒド化合物が生成する。

この酸化反応に使用しうる酸化剤としては、過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウムなどの過ヨウ素酸アルカリ塩等を用いることができる。

酸化剤の使用量は、式(2)、(5)又は(8)の化合物1モルに対して1~10当量、好ましくは3~6当量の範囲である。

酸化反応温度は、0~10℃、好ましくは0~4℃の範囲で行うことができる。

生成した(3)、(6)、(9)、(10)及び(11)のアルデヒド化合物は、それ自体既知の還元的アルキル化法に従い、脂質の1級アミノ基と反応させることができ、これによって本発

明が目的とする一般式(I)、(II)及び(III)で示される脂質結合グリコサミノグリカンを得ることができる。

上記反応に用いることのできる脂質としては、L-(ロホスファチジル)エタノールアミン、DL-ホスファチジル-L-セリン、エタノールアミンプラスマロゲン、セリンプラスマロゲン等を挙げることができる。

上記還元的アルキル化反応は、水、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)又はジメチルホルムアミドのような溶媒中において、式(3)、(6)、(9)、(10)又は(11)のアルデヒド化合物とクロロホルム等に溶解した脂質とを混合して均一な溶液にし、通常15~60℃の温度で反応させ、それと同時に又はその後に、例えはシアノ水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤を用いて還元することにより一般式(I)、(II)及び(III)の化合物を製造することができる。

本発明の一般式(I)、(II)及び(III)で示

される脂質結合グリコサミノグリカンの脂質の含有量は、0.05~50%、好ましくは2~10%の範囲である。

以上に述べた各種の方法で製造される脂質結合グリコサミノグリカンの分離、精製方法としては、反応液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱物を採取することで未反応の脂質又は脂質を除き、さらに該沈澱物を疎水クロマトに負荷し、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム又は塩化ナトリウム等の塩の水溶液で洗浄することで未反応のグリコサミノグリカンを除去する。この後、該疎水クロマトに吸着した脂質結合グリコサミノグリカンを10~50%メタノール水溶液で溶出する方法で行うことができる。

本発明の脂質結合グリコサミノグリカン又はその薬学的に許容される塩を、固体又は液体の医薬用担体又は希釈剤、即ち、賦形剤、安定剤等の添加剤とともに含む製剤とすることが好ましい。

脂質結合グリコサミノグリカンの塩は水溶性

であるため、注射剤として用いる場合に最適である。該医薬製剤において、前記有効成分の担体成分に対する割合は、1~90重量%の間で変動させよう。

剤形及び投与形態としては、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、丸剤もしくは液剤等の剤形にして、又は原来のまま経口投与してもよいし、注射剤として静脈内投与、筋肉内投与又は皮下投与してもよい。また、坐剤、軟膏剤、パップ剤、貼付剤、リニメント剤、ローション剤等の剤形にして、外用剤として用いることもできる。また、注射用の粉末にして、用時調製して使用してもよい。

経口、経腸、非経口もしくは局所投与に適した医薬用の有機又は無機の、固体又は液体の担体もしくは希釈剤を、本発明の脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を含む医薬製剤を調製するために用いることができる。水、ゼラチン、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、動植物油脂、ベンジルアルコール、

ガム、ポリアルキレングルコール、石油樹脂、やし油、ラノリン又は医薬に用いられる他のキャリア（担体）は全て、本発明品の担体として用いることができる。また、安定剤、潤滑剤、乳化剤や、浸透圧を変えたり、製剤の適切なpHを維持するための塩類を補助剤として適宜用いることもできる。

顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤又はカプセル剤の場合には、該医薬製剤は本発明品を5～80重量%含有していることが好ましく、液剤の場合には、1～30重量%含有していることが好ましい。また、注射剤の場合は1～10重量%、坐剤の場合は1～50重量%が好ましい。局所投与用である軟膏剤又はバップ剤等として用いる場合は、0、1～10重量%含有していることが好ましい。

臨床投与量は、経口投与の場合、成人に対し有効成分として、1日量100～2000mgを内服することが好ましいが、年令、症状により適宜増減することも可能である。前記1日量を1回、又

は適当な間隔をおいて2もしくは3回に分けて投与することが好ましい。

また、注射剤として用いる場合には、成人に対し有効成分として、1回量10～1000mgを投与することが好ましく、軟膏剤又はバップ剤等として用いる場合は、前記含有割合のものを適量患部に塗布することが好ましい。

【発明の効果】

本発明品の糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩は、細胞接着阻害作用を有し、かつ毒性もないで癌転移抑制剤として有用である。

【実施例】

次に実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、実施例に限定されるものではない。

以下の実施例において、糖脂質結合グリコサミノグリカンのリン含量、糖脂質含量、及びグリコサミノグリカン（GAG）含量は、以下の方法で測定した。

測定法

た塩酸を除き、脱水ボウ硝で乾燥後、減圧濃縮し、次の（GLC）用試料とする。

気相液相クロマトグラフィー（GLC）

GC-15A（島津製作所）

充填剤：PEG-HT 5% Uniport HP 60/80

ガスクロ工業牌

運転条件：試料氣化室温度 350°C

カラム温度：190～200°C

カラム：3φ×2m

流速：N₂ 4.5 ml/min.

実施例1

還元末端限定酸化法による糖脂質結合グリコサミノグリカンの製造

(1) 還元末端限定酸化グリコサミノグリカンの製造

1) 還元末端残基開環ヒアルロン酸の製造

ヒアルロン酸（鶴冠由来、MW 1万：HAI12000ngを200mlの0.05Mホウ酸塩緩衝液（pH8.3）に溶解し、18.2mgの水素化ホウ酸ナトリウムを加えて室温で5時間反応させた。

1. GAGの定量

(1) ウロン酸を含有するGAG：カルバゾール硫酸法 (Bitter-Muir法) ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 4, 330-334 (1962)

(2) ガラクトースを含有するケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸：アンスロン法 Biochem.J. 50, 298-303 (1952)

2. 糖脂質の定量

(1) リンの定量：モリブデンブルー法、無機応用比色分析、4、共立出版株式会社、編集代表 平野四歳 130～135頁

(2) 脂肪酸の定量：10～50mgのGAG-脂質を1.0mlの1N-水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、100°Cで1時間加水分解する。反応液を1N-塩酸水溶液で酸性にした後、クロロホルムで抽出し、クロロホルム相を水で洗浄する。脱水ボウ硝で乾燥後、減圧下で溶媒を除去。残渣に3%塩酸（ガス）含有メタノールを加え、封管中、100°Cで3時間加熱後、石油エーテルで3回抽出する。石油エーテルを3回水洗し、混入し

特開平4-80202(ア)

酢酸でpH4.5にしてエタノールを加えて生成物を沈澱させ、次いで生成物をエタノールで洗浄した。これによりロット番号100の還元末端残基開環ヒアルロン酸(R-HA1)を得た。

2) 還元末端限定酸化ヒアルロン酸の製造

1700mgのR-HA1(ロット番号100)を250mlの40mMイミダゾール(pH6.5)に溶解し、0℃で139.96mgの過ヨウ素酸ナトリウムを加え、1時間反応させた。反応液にエタノールを加えて生成物を沈澱させ、次いでエタノールで洗浄した。これによりロット番号200の還元末端限定酸化ヒアルロン酸(O-HA)1600mgを得た。

3) 他のグリコサミノグリカンの還元末端限定酸化物(O-GAG)の製造

ヒアルロン酸(鶴冠由来、MW5万: HA5, MW15万: HA15)、

コンドロイチン(コンドロイチン硫酸Aから酸性メタノール溶液で脱硫酸したもの、MW1.5万、: CH)、

コンドロイチン硫酸C(蚊歎骨由来、MW1万: CS(S1), MW3万: CS(S3), MW6万: CS(S6))、
コンドロイチン硫酸A(蚊歎骨由来、MW3万: CS(W))、

デルマタン硫酸(豚皮由来、MW1.5万: DS)、
ヘパリン(豚小腸由来、MW1.5万: Hep)、
ケラクシ硫酸(牛角膜由来、MW1.5万: KS)
を原料として上記の1)に準じて表2の条件で還元末端残基開環グリコサミノグリカン(R-GAG)を製造した。ひきつづき、上記の2)の方法に準じて表3の条件で還元末端限定酸化グリコサミノグリカン(O-GAG)を製造した。

表 2

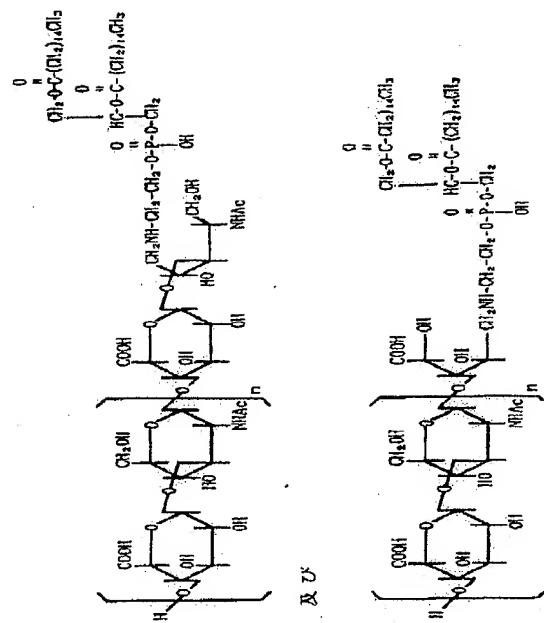
ロット番号	生成物	反応条件 GAG/NaBH ₄ (mg/mg)	収量 (mg)
100-2	R-HA5	5000/94.58	4720
100-3	R-HA15	1000/6.31	971
101	R-CH	1000/63.05	867
102	R-CS(S1)	1000/94.58	880
102-2	R-CS(S3)	1000/31.50	897
102-3	R-CS(S6)	1000/15.76	869
103	R-CS(W)	1000/31.50	823
104	R-DS	150/9.46	130
105	R-Hep	1000/63.05	772
107	R-KS	20/1.28	14.6

表 3

ロット番号	生成物	反応条件 R-GAG/NaIO ₄ (mg/mg)	収量 (mg)
200-2	O-HA5	4500/77.0	4310
200-3	O-HA15	900/5.14	815
201	O-CH	800/45.65	766
202	O-CS(S1)	800/68.48	715
202-2	O-CS(S3)	800/22.83	774
202-3	O-CS(S6)	800/11.41	699
203	O-CS(W)	800/22.83	697
204	O-DS	100/5.71	82
205	O-Hep	700/39.95	666
207	O-KS	10/0.57	7

(2) L-(α -ホスファチジル)エタノールアミン・ジバルミトイール結合グリコサミノグリカン (GAG-PPEADP) の製造

1) L-(α -ホスファチジル)エタノールアミン・ジバルミトイール結合ヒアルロン酸の製造



n : 平均2.4

3000 mgのロット番号200の0-HAを0.05Mリン酸塩緩衝液(pH7.0)100mlに溶解し、クロロホルム：メタノール=2:1の溶媒で(1mg/ml)に溶解したL-(α -ホスファチジル)エタノールアミン・ジバルミトイール(PPEADP)を69.2μl加えた。さらに、メタノールを加えて均一な溶液にして、50°Cで1時間反応させ、その後、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを2.5mgを加えた。2時間50°Cで反応させ、減圧下濃縮し、酢酸飽和のエタノールを5倍量加入して生じた沈澱を汎取した。沈澱を0.3M塩化アンモニウム塩で溶解し、疎水クロマトカラム(TSKgelフェニルトヨバル 650M 400ml)に吸着し、充分に0.3M塩化アンモニウム水溶液で洗浄し、30%メタノール水溶液で溶出した。素通り及び洗浄画分に未反応のHAが溶出され、30%メタノール水溶液の画分に目的とする本品が溶出した。30%メタノール水溶液溶出画分を減圧下濃縮し、透析で脱塩後、凍結乾燥してロット番号300の白色粉末を得た。

収量: 40mg

PPEADP含量: 6.21%

ヒアルロン酸含量: 62.12%

疎水クロマトグラフィ: 図-1に示す。

疎水クロマトグラフィの条件

カラム: TSK gel フェニル5PW
(7.5φ × 7.5cm)

溶媒: 0~5分 0.3M塩化アンモニウム水溶液

5~5.0分 30%メタノール水溶液

溶出速度: 0.5ml/分

圧: 7kg/0.5cm²

分画容量: 1ml/管

検出: 0 D_{250nm}

検体: 100μl (1mg/ml 0.3M塩化アンモニウム水溶液)

2) その他の糖脂質結合グルコサミノグリカンの製造

表3に示した0-GAGとPPEADPとを表4に示した条件で、上記(2)-1)の方法に準じて糖脂質結合

合グリコサミノグリカンを製造した。得られた生成物の分析値を表4に示した。

ロット番号	生 成 物	反 応 条 件 0-GAG/PPEADP/NabH ₄ CN	吸 量 (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
300-2	R-HA5-PPEADP	1000/13.84/5.03	42	1.33	63.43
300-3	R-HA15-PPEADP	700/3.23/1.17	35	0.46	63.35
301	CH-PPEADP	700/32.25/11.73	30	4.27	59.10
302	CS(S1)-PPEADP	700/48.44/11.60	36	5.89	63.04
302-2	CS(S3)-PPEADP	700/16.15/5.89	29	2.22	65.52
302-3	CS(S5)-PPEADP	500/5.77/2.09	20	1.07	67.13
303	DS(W)-PPEADP	500/11.53/4.19	22	2.23	67.48
304	DS-PPEADP	50/2.31/0.84	3.1	4.21	66.10
305	Hep-PPEADP	500/23.07/6.38	3.8	4.30	74.65
306	HS-PPEADP	20/0.92/0.34	3.3	4.09	68.40
307	KS-PPEADP	7/0.33/0.12	0.5	3.97	66.24

表 4

参考例 1

フィブロネクチンを予め塗布した培養皿に塗布した磷脂質結合グリコサミノグリカンのBHK 21細胞の接着に対する効果

9.6穴培養皿を5μl/孔ウシ血漿フィブロネクチン100μlで塗布した後、洗浄し、実施例1で得た各種磷脂質結合グリコサミノグルカン100μl/穴を表5に示す各濃度で塗布した。

別に、100mm径の培養皿に培養したBHK 21細胞（新生ハムスター腎細胞）を0.1mg/mlの濃度のトリプシン溶液5mlを加え、37℃で5分間処理した。次いで、1mg/mlの大トリアブシンインヒビター溶液5mlを加え、トリプシンを不活性化した後、遊離した細胞を遠心により集めた。細胞は2回洗浄後、1mlあたり1×10⁶個細胞となるように単一細胞懸濁液とした。

得られた単一細胞懸濁液100μl (1×10⁶個細胞)を、上記フィブロネクチンと磷脂質結合グリコサミノグリカンを塗布した培養皿に加え、

37℃で1時間処理した。接着しなかった細胞を洗浄した後、接着した細胞を2%ホルムアルdehyド固定し、直接位相差顕微鏡で観察して、その細胞数をカウントした。

結果を表5に示す。表5は、各濃度における細胞接着の変動を示す。値は3回ないし4回の測定の平均を示し、誤差（標準偏差）もあわせて表した。

なおそれぞれの遊離グリコサミノグリカンおよび未結合の磷脂質のみでは高濃度にしても全く細胞接着阻害効果を示さなかった。

表 5

ロット番号 μg/ml	302-3 (CS(S6)-PPEADP)
1	91.4% ± 6.8%
2	60.9% ± 4.5%
5	23.0% ± 0.2%
10	1.3% ± 1.2%

参考例 2

各種培養細胞の細胞接着物質に対する磷脂質結合グリコサミノグリカンの接着阻害効果

実施例1で得た糖脂質結合グリコサミノグリカンについて、BHK21細胞（新生ハムスター腎細胞）、CEF（ニワトリ胚線維芽細胞）、B16F10（高転移性マウスマエラノーマ細胞）、CHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞）、及びbaEC（ウシ大動脈内皮細胞）の各種細胞群に対しての、フィプロネクチン(FN)、ラミニン(LN)、I型コラーゲン(Co11)及びビトロネクチン(VN)による接着に対する阻害効果を検討した。

各5μg/mlのウシ血漿フィプロネクチン、マウスEHS腫瘍細胞由来ラミニン、ラット臍由來I型コラーゲン、及びウシ血清ビトロネクチンをそれぞれ96穴培養皿に塗布し、参考例1と同様にして、実施例1で得た糖脂質結合グリコサミノグリカンを塗布した後、それぞれBHK21細胞、CEF細胞、B16F10細胞、CHO細胞、及びbaEC細胞の単一細胞懸濁液100μl(1×10⁴個細胞)を加え細胞接着の変動を見た。対照として糖脂質結合グリコサミノグリカン

を添加せず、接着物質のみの細胞接着を100%とした。結果を表6に示す。

なお、表6中で相対接着細胞数として、全くあるいは殆ど細胞接着しなかった場合(0~10%未満)を-、10~30%未満を+、30~50%未満を++、50~70%未満を+++、70~90%未満を++++、そして90~100%の細胞が接着した場合を+++++と半定量的に表した。

表6

他の糖脂質結合グリコサミノグリカンの細胞接着性の結果

コット番号	用量(μg/ml)	細胞/接着物質(5μg/ml)					
		BHK21	CEF	B16F10	CHO	FN	VN
301 (CH-PFEAP)	10	+++	+++	-	-	-	-
	100	+++	+++	-	-	-	-
302 (CS(S1)-PFEAP)	10	+	+	-	-	-	-
	100	++	-	-	-	-	-
302-2 (CS(S2)-PFEAP)	10	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-
302-3 (CS(S3)-PFEAP)	10	++	+	-	-	-	-
	100	+	-	-	-	-	-
303 (CS(N)-PFEAP)	10	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-
304 (NS-PFEAP)	10	+++	-	-	-	-	-
	100	+++	-	-	-	-	-
305 (Hep-PFEAP)	10	++++	-	-	-	-	-
	100	+++	-	-	-	-	-
HAI	100	++++	+++	+++	+++	+++	+++
HAS	100	++++	+++	+++	+++	+++	+++
HAS	100	++++	+++	+++	+++	+++	+++
CV	100	++++	+++	+++	+++	+++	+++
CS(S1)	100	++++	+++	+++	+++	+++	+++
CS(S3)	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CS(S6)	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CS(W)	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DS	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Hep	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NS	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CP5 (1)	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PFEAP	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++

4. 図面の簡単な説明

図1は実施例1-(2)-1の焼脂質結合グリコサミノグリカンの疎水クロマトグラフィーを示す。

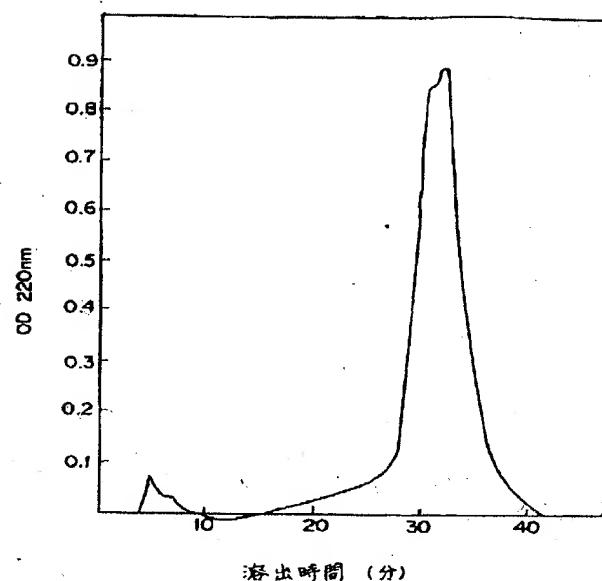


図 1

手 続 補 正 書

平成 3年 7月 23日

特許庁長官 横沢 亘

1. 事件の表示

平成2年特許願第193818号

2. 発明の名称

焼脂質結合グリコサミノグリカン

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 生化学工業株式会社

4. 代 理 人

住 所 〒107 東京都港区赤坂2-10-8 第一信和ビル
氏 名 齋理士 (7866) 搭 国 電話 (3586)1736~

5. 補正命令の日付 目次

6. 補正の対象 明細書の特許請求の範囲及び発明の詳細な説明の各項

7. 補正の内容

方式審査

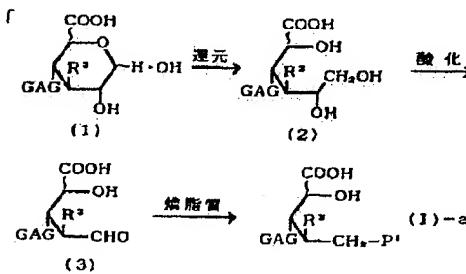


I. 特許請求の範囲の欄

別紙1のとおり訂正する。

II. 発明の詳細な説明の欄

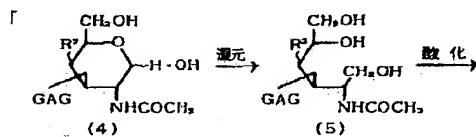
(1) 明細書6頁表1 テルマクン硫酸のヘキ

ソサミンの欄の「GalNAc(5S)」を
「GalNAc(4S)」と訂正する。(2) 同6頁末行の「O-硫酸」を「O-硫酸」
と訂正する。(3) 同7頁9行~9頁7行を別紙2のとおり訂
正する。(4) 同11頁3行~11頁4行の反応式を次の
とおり訂正する。

(5) 同 11 頁 5 行の「P'」は 1 級アミノ基を有する糖脂質を示す」の前に「R」は前述と同じ、「」を挿入する。

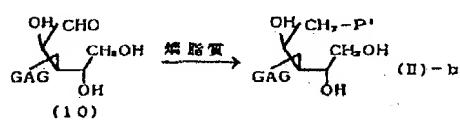
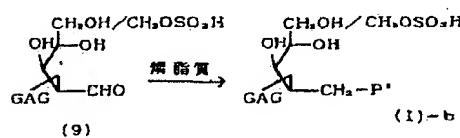
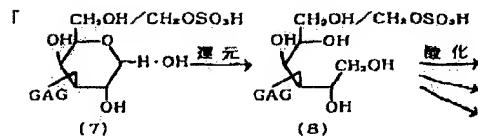
(6) 同 11 頁下から 2 行の「式 (I)」を「式 (I) - a」と訂正する。

(7) 同 12 頁 3~4 行の反応式を次のとおり訂正する。



(8) 同 12 頁下から 3 行の「式 (II)」を「式 (II) - a」と訂正する。

(9) 同 13 頁 2~5 行の反応式を次のとおり訂正する。



(10) 同 14 頁 3~4 行の「(I)、(II)」を「(I)-b、(II)-b」と訂正する。

(11) 同 16 頁下から 1 行と 2 行の間に次の記載を挿入する。

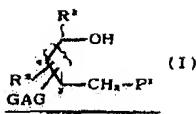
「上記還元末端限定酸化法で製造される化合物を表 A に具体的に示す。」

化合物番号	構造式	原料グリコサミノグリカン (GAG)
I - (1)		ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリン
I - (2)		コンドロイチン硫酸K、コンドロイチン ポリ硫酸
I - (3)		ケラタン硫酸
I - (4)		ケラタンポリ硫酸
II - (1)		ヒアルロン酸、コンドロイチン
II - (2)		コンドロイチン硫酸AもしくはK、コン ドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸
II - (3)		ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸
III		ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸

別紙 1

特許請求の範囲

1. 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P'は1級アミノ基を有する糖脂質を示す。

(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリンから還元性末端のグルクロロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイスロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はCOOH基を示し、R'はOH基を示す。

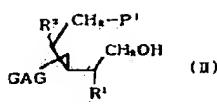
(2) GAGがコンドロイチン硫酸K又はコンド

ロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はCOOH基を示し、R'はOSO₃H基を示す。

(3) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はCH₂OSO₃H基を示し、R'はOH基を示す。

(4) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はCH₂OSO₃H基を示し、R'はOH基を示す。

2. 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P'は1級アミノ基を有する糖脂質を示し、

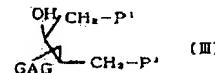
(1) GAGがヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R'はNHC₂COCH₃基を示し、R''はOH基を示す。

(2) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R'はNHC₂COCH₃基を示し、R''はOSO₃H基を示す。

(3) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫

酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R'及びR''はOH基を示す。

3. 一般式

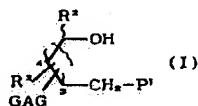


を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P'は1級アミノ基を有する糖脂質を示し、GAGはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示す。

別紙2

(1) 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P'は1級アミノ基を有する糖脂質を示し、

(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリンから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R''はCOOH基を示し、R'''はOH基を示す。

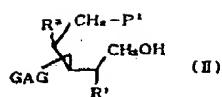
(2) GAGがコンドロイチン硫酸K又はコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸

部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R''はCOOH基を示し、R'''はOSO₃H基を示す。

(3) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R''はCH₂OSO₃H基を示し、R'''はOH基を示す。

(4) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R''はCH₂OSO₃H基を示し、R'''はOH基を示す。

(II) 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P'は1級アミノ基を有する糖脂質を示し、

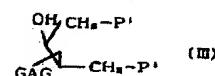
(1) GAGがヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R'はNHCOCH₂基を示し、R'はOH基を示す。

(2) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R'はNHCOCH₂基を示し、R'はOSO₂H基を示す。

(3) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫

酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R'及びR'はOH基を示す。

(III) 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P'は1級アミノ基を有する糖脂質を示し、GAGはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示す。